

На правах рукописи

Аникеенок Марина Олеговна

**ИНДУКЦИЯ ATM/ATR СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА В ОТВЕТ НА
ДНК – ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ HELICOBACTER PYLORI**

03.00.07 - Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2009

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета им. В.И.Ульянова-Ленина.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Гатауллин Ильгиз Габдуллович

доктор биологических наук, старший научный
сотрудник Коксин Владимир Петрович

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов
УрО РАН, г. Пермь.

Защита состоится «18» июня 2009 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И.Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «18» мая 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Онкологические заболевания являются одной из основных причин смерти во всем мире, и их частота неуклонно растет. XXI век ознаменовался бурным прогрессом в познании природы злокачественных новообразований, их причин и способов предотвращения. Аденокарцинома желудка – один из наиболее распространенных типов рака в мире. Это определяет актуальность поиска причин образования предраковых патологий желудка.

Известны три основные этиологические группы агентов, вызывающих развитие рака: канцерогенные вещества, физические и биологические факторы. Роль канцерогенов химической природы, а также различного вида облучений в повреждении ДНК, мутациях и развитии злокачественных новообразований неоспорима. В месте с тем, в этиологии злокачественных опухолей важную роль играют такие факторы, как инфекционные агенты различной природы. Пятая часть раковых заболеваний во всем мире возникает в результате хронических инфекций, основными возбудителями которых являются вирусы гепатита В (рак печени), вирусы папилломы человека (рак шейки матки), *Helicobacter pylori* (рак желудка), шистосомы (рак мочевого пузыря), печеночные двуустки (рак желчных протоков) и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (саркома Капоши и лимфомы). По классификации ВОЗ, все эти агенты относятся к биологическим канцерогенам [Баженов, Баженова, 2006]. Достаточно изучена природа вирусного канцерогенеза, в то время как механизм развития рака в результате бактериальной инфекции до конца не ясен.

Существует убедительные доказательства того, что бактериальные инфекции ассоциируются с развитием различных типов рака. Например, *Salmonella typhi* ассоциируется с раком желчного пузыря [Vaishnavi *et al.*, 2005; Lax, Thomas 2002; Dutta, 2002; Shukla, 2000], *Streptococcus bovis* – с раком толстой кишки [Biarc *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 2004; Ellmerich *et al.*, 2000; Zarkin *et al.*, 1990], и *Chlamydia pneumoniae* – с раком легких [Littman *et al.*, 2004; Koyi *et al.*, 2001; Anttila *et al.*, 2003]. Важные механизмы, с помощью которых бактериальные агенты могут вызывать канцерогенез, включают хроническую инфекцию и иммунную реакцию [Kuper *et al.*, 2000]. Было показано, что некоторые бактерии выделяют токсины, нарушающие клеточный цикл, в результате чего изменяется характер роста клеток [Littman *et al.*, 2004; Koyi *et al.*, 2001]. В результате повреждений ДНК, аналогичных тем, которые вызывают канцерогенные вещества, нарушается контроль нормального клеточного деления и апоптоза [Nougayrede *et al.*, 2005; Lara-Tejero *et al.*, 2000].

В настоящее время доказана роль *H. pylori* в патогенезе гастрита, дуоденита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, лимфомы желудка и рака желудка [Григорьев, 1999]. В то же время вопрос об абсолютной роли *H. pylori* в возникновении рака желудка остается спорным, и многие специалисты не согласны с ведущей ролью этой бактерии в инициации канцерогенеза. Такие противоречия объясняются тем, что практически не изучено действие патогена непосредственно на ДНК хозяина и молекулярный статус клетки в отсутствии иммунных реакций, влияния другой микрофлоры и т.

д. Понимание тонких молекулярных механизмов атаки *H. pylori* на эукариотические клетки, повреждения клеточного материала, в том числе и ДНК, а также влияния на сигнальные каскады клетки позволит правомерно говорить о данной бактерии как об опасном канцерогене. Актуальность таких исследований несомненна, а установление факта генотоксичности инфекции *H. pylori* обосновывает необходимость в информировании населения и проведении масштабной эрадикации данного патогена.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования явилось установление генотоксического потенциала *H. pylori*, связанного с активацией АТМ протеинкиназы и ее субстратов в ответ на инфекцию, вызванную данным патогеном в культуре клеток аденокарциномы желудка и карциномы эндометрия человека.

В связи с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Оценить генотоксический потенциал штаммов *Helicobacter pylori* дикого типа и дефектного по островку патогенности ΔРАІ прямым методом ДНК-комет.
2. Установить возможность активации ключевых киназ: атаксия-телеангиэктазия, мутантная (АТМ), и относящаяся к атаксии-телеангиэктазии (АТР) клеточного ответа в ответ на двунитевые разрывы ДНК в клетках HeLa и AGS после инфекции *Helicobacter pylori*.
3. Охарактеризовать спектр известных субстратов АТМ/АТР киназ, активированных инфекцией *Helicobacter pylori*.
4. Идентифицировать белки, фосфорилированные АТМ киназой после инфекции *Helicobacter pylori*; проанализировать степень активации ее известных субстратов и новых белков, впервые идентифицированных как субстраты АТМ киназы.
5. Выявить возможное участие киназ АТМ и ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) в активации митоген активированных (МА) белков стрессового ответа и формировании фенотипа «колибри».

Научная новизна. Впервые получены данные об активации АТМ/АТР сигнального каскада, ключевого в ответе на появление двунитевых разрывов ДНК, после инфекции штаммами *H. pylori* P12 дикого типа и мутанта *H. pylori* ΔРАІ, дефектного по островку патогенности, в культуре клеток аденокарциномы желудка (AGS) и карциномы эндометрия человека (HeLa). Впервые приведены результаты, указывающие на активацию целого ряда субстратов АТМ киназы в ответ на инфицирование хеликобактером. С помощью молекулярных методов и методов биоинформатики впервые проведен системный анализ белков, фосфорилированных после инфицирования *H. pylori*. В ходе работы идентифицированы новые, неизвестные субстраты АТМ киназы, фосфорилированные после инфицирования *H. pylori*. Впервые с помощью прямого метода ДНК-комет получены свидетельства наличия ДНК-повреждающего действия штамма *H. pylori* ΔРАІ, что позволило показать наличие генотоксического потенциала бактерии вне зависимости от присутствия островка патогенности. Установлено, что АТМ киназа принимает участие в формировании фенотипа «колибри», а также взаимодействует с внеклеточной сигнал–регулируемой киназой (ERK) – белком стрессового ответа клетки.

Представленные результаты вносят вклад в понимание роли инфекции *H. pylori* в молекулярном ответе атакованной клетки и ее последующей неопластической трансформации на пути развития аденокарциномы желудка.

Практическая значимость. Проведенные исследования намечают новое направление в предотвращении развития онкологических патологий эпителиальной этиологии, связанных с инфекцией *H. pylori*. Особое значение имеет обнаруженный факт наличия генотоксических изменений ДНК эпителиальных клеток при инфицировании штаммом *H. pylori* ΔРАІ, дефектным по островку патогенности и свидетельствующий об отсутствии связи повреждений ДНК эпителия человека и генетических детерминант патогенности, известных на сегодняшний день для хеликобактера. В ходе экспериментальной работы разработана и опробована оригинальная методика цитометрического определения фосфорилированной формы АТМ киназы, позволяющая оценить уровень активации киназ после инфицирования.

Полученные результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов клеточного ответа на инфекцию *H. pylori* и впервые демонстрируют наличие фосфорилирования субстратов АТМ, среди которых обнаружены не только известные белки клеточного цикла, но и новый сплайсинг-фактор. Данные результаты имеют фундаментальное значение для развития молекулярно-биологических методов анализа и борьбы с инфекцией *H. pylori*. Возможность идентификации активированных белков с помощью MALDI-анализа после двухмерного электрофореза позволяет упростить и удешевить процедуру идентификации, исключив использование широкого спектра дорогостоящих антител.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа проводилась в соответствии с тематическим планом НИР КГУ 1.15.06 «Механизмы регуляции функциональной активности клетки». Исследования автора по тематике работы поддержаны аналитической федеральной программой «Развитие научного потенциала высшей школы», гранты № 2.1.1.1005, 2.1.1.3222, 2.1.1./920 и РФФИ 07-04-01051. Авторские исследования получили персональную поддержку фонда Палаты депутатов г. Берлина (2006-2007гг.), что позволило на базе Института Инфекционной Биологии Макса Планка, (Берлин, Германия) провести цитометрические исследования, MALDI-анализ и иммунологический анализ, а также детекцию повреждений ДНК методом ДНК-комет. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на конференциях НОЦ КГУ Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2003, 2004), Междисциплинарной конференции с международным участием «Новые биобиокибернетические и телемедицинские технологии XXI века для диагностики и лечения заболеваний человека» (Петрозаводск, 2003), IX Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине», (Казань, 2004), IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов

(Новосибирск, 2008), международной конференции “Modern biology Bionews” (Казань, 2008), а также на итоговых конференциях КГУ (2008-2009).

Положения, выносимые на защиту:

1. Длительное инфицирование клеток AGS мутантным штаммом *H. pylori* ΔРАІ, дефектным по островку патогенности, приводит к появлению двойных разрывов ДНК атакованной клетки.

2. Инфицирование *H. pylori* P12 культуры клеток AGS и HeLa приводит к активации АТМ протеинкиназы и не приводит к фосфорилированию АТР протеинкиназы.

3. В результате запуска АТМ сигнального каскада инфекцией *H. pylori* активируются субстраты АТМ киназы – белки чекпоинт 1 (Chk1), чекпоинт 2 (Chk2), репликационный белок 32А (RPA32A) и гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин F (hnRNP F).

4. В качестве субстрата АТМ киназы, активированной в ответ на инфицирование *H. pylori*, впервые идентифицирован новый белок – сплайсинг-фактор аргинин/серин 3.

5. АТМ протеинкиназа вносит вклад в формирование фенотипа «колибри» – характерного морфологического изменения клеток эпителия человека при инфицировании их *H. pylori* P12.

6. Ингибирование фосфорилирования АТМ протеинкиназы приводит к снижению, или к полному отсутствию активации белка стрессового ответа клетки ERK.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 113 страницах, содержит 3 таблицы и 27 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 235 источников, из них 210 на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы и клеточные культуры. Клетки инфицировали штаммом *H. pylori* P12 *sag+*, *vac+*, дикого типа, выделенного из биоптата пациента с язвой двенадцатиперстной кишки [Schmitt, Haas, 1994], и мутантом *H. pylori* ΔРАІ, дефектным по наличию островка патогенности [Odenbreit *et al.*, 2001]. В работе были использованы две линии опухолевых клеток человека: HeLa (карцинома эндометрия) и AGS (ATCC CRL 1739 аденокарцинома желудка) (коллекция Института Инфекционной Биологии Макса Планка, Берлин, Германия).

Разделение белков клеточных лизатов для определения наличия фосфорилированных форм АТМ и АТР киназ проводили в градиентном геле, так как молекулярная масса исследуемых киназ составляет 370 кДа, что затруднило

разделение даже в 8% акриламидном геле. Остальные белки разделяли в 10% ПААГ в модификации Лаемли [Laemmli, 1970]. Также проводили двумерный электрофорез для лучшего разделения белков и дальнейшей идентификации с помощью масс-спектрометрии. Белки в геле визуализировали окрашиванием Кумасси-G250 (Serva).

Иммуноблотинг клеточных лизатов проводили с использованием антител к АТМ киназе pS1981, фосфо-ATR киназе (Ser428), фосфо-(Ser/Thr) АТМ/ATR субстратам, фосфо-чекпоинт 2 (Thr68), фосфо-чекпоинт 1 (Ser345), фосфо-p53 (Ser15) (16G8), репликационному белку A 32 kDa субъединице (MA34): sc-53496, фосфо-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), фосфо-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), фосфо-ERK 1,2, фосфо-тирозину, белку Cag A, β -актину. Иммунодетекцию осуществляли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена антител против иммуноглобулинов мыши и кролика и набора ECL (Amersham, Великобритания).

Методом проточной цитометрии определяли изменение уровня фосфорилированной формы АТМ в клетках HeLa на проточном цитометре FACS Calibur (США), используя антитело против фосфорилированной формы АТМ p1981 (Sigma). Для иммунодетекции использовали флюорохром конъюгированное анти-мышинное антитело, полученное из сыворотки осла IgG-Alexa488 с длинами волн возбуждения и регистрации соответственно, 495нм/519нм (Invitrogen). Анализ цитометрических данных проводили в специализированной компьютерной программе обработки Cell Quest Pro.

Генотоксический эффект *H. pylori* определяли с помощью прямого метода гель-электрофореза изолированных клеток или ДНК-комет, используя Comet Assay Kit (Trevigen). Генотоксичность определяли по одному из наиболее используемых информативных параметров – момент хвоста кометы (Tail Moment, ТМ), который рассчитывали как произведение процентного содержания ДНК в "хвосте" на длину "хвоста", в условных единицах [Olive *et al.*, 1990; Olive *et al.*, 1992].

Масс-спектрометрический анализ проводили в лаборатории Института Инфекционной Биологии Макса Планка (Берлин, Германия) с помощью MALDI-TOF/TOF масс спектрометра. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Mascot в базе данных NCBI.

Обработка агентами. Активацию и ингибирование определенных киназ производили различными агентами с предварительным установлением оптимальных концентраций. АТМ/ATR киназы активировали доксорубицином (1 мкМ, 4 ч) в среде RPMI [Kurz *et al.*, 2004] и гидроксимочевинной (2 млМ, 2 ч) [Stiff *et al.*, 2006]. Для ингибирования киназ использовали АТМ/ATR ингибитор (Calbiochem), обрабатывая клетки HeLa (2.5 мкг/мл) и AGS (0.7 мкг/мл) за 18 ч до инфицирования [Won *et al.*, 2006]. Для ингибирования ДНК-ПК применяли DNK-ПК III и DNK-ПК I ингибиторы (Calbiochem) (25 мкМ), обрабатывая клетки

в среде 2 ч с последующей заменой среды и инфицированием [Kashishian *et al.*, 2004].

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 5.11 с использованием непараметрического критерия Колмогорова – Смирнова в качестве критерия достоверности. При этом $p < 0.05$ принимали за достоверный уровень значимости.

Результаты исследования

Активация ключевых киназ ATM и ATR в клетках HeLa и AGS, инфицированных *H. pylori*

При появлении двунитевых разрывов происходит автофосфорилирование ATM киназы, а также сходной по строению и функциям, но менее изученной ATR киназы. Таким образом, по обнаружению фосфорилированной формы той или иной киназы можно судить о возможных повреждениях ДНК в эукариотической клетке, инфицированной бактерией *H. pylori*.

На первом этапе нашей работы мы провели электрофоретическое разделение лизата неинфицированных и инфицированных клеток, а также обработанных различными агентами образцов с последующим иммуноблотингом, используя специфические антитела против фосфорилированной формы ATM (p-ATM) и фосфорилированной формы ATR (p-ATR). Было показано, что при инфицировании клеток HeLa и AGS (рисунок 1) после 6 часов инкубирования с *H. pylori* P12 происходило фосфорилирование ATM киназы. В то же время ни в контроле, ни при инфицировании в течение меньшего времени p-ATM не была обнаружена. Также при обработке клеток после шестичасовой инфекции ATM/ATR ингибитором активация ATM не была зафиксирована.

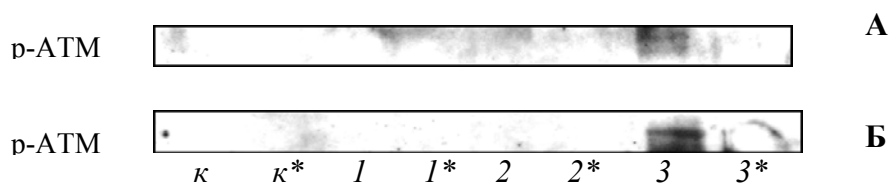


Рисунок 1 – Содержание фосфорилированной формы ATM в клетках HeLa (А) и AGS (Б) после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 200 бактерий на клетку. Дорожки: к – клетки без обработки бактериями; 1–3 – клетки через 90 мин, 3 ч и 6ч инфицирования соответственно; * – обработка ATM/ATR ингибитором.

При длительном инфицировании (24 ч) обеих клеточных линий активная форма ATM киназы обнаружена не была что, возможно, связано с дефосфорилированием этого белка. Иммуноблотинг с антителом против p-ATR показал, что активная форма данной киназы присутствует как в инфицированных, так и в интактных клетках HeLa.

Вестерн-блот анализ позволил нам обнаружить активную ATM киназу, однако он не дает четкого представления о количественном увеличении активации в опыте по сравнению с неинфицированными клетками. Проточная

цитометрия является более точным и чувствительным методом. Помимо дикого типа *H. pylori* P12, клетки инфицировали и мутантным штаммом *H. pylori* ΔРАІ. Также проводили инфицирование различным количеством бактерий на клетку, отличающимся более чем в 2 раза. В результате пятичасовой инфекции диким типом штамма мы зафиксировали повышение уровня р-АТМ по сравнению с контрольным, при этом увеличение концентрации бактерий на клетку привело к заметному росту количества р-АТМ (рисунок 2, А). Также увеличение происходило и при инфицировании мутантным штаммом, причем уровень р-АТМ был приблизительно одинаков как при концентрации 200 бактерий на клетку, так и при 500, составляя более 50% от контрольного (рисунок 2, Б). Превышение уровня р-АТМ в 3 раза в позитивном контроле говорит об оптимальных условиях эксперимента.

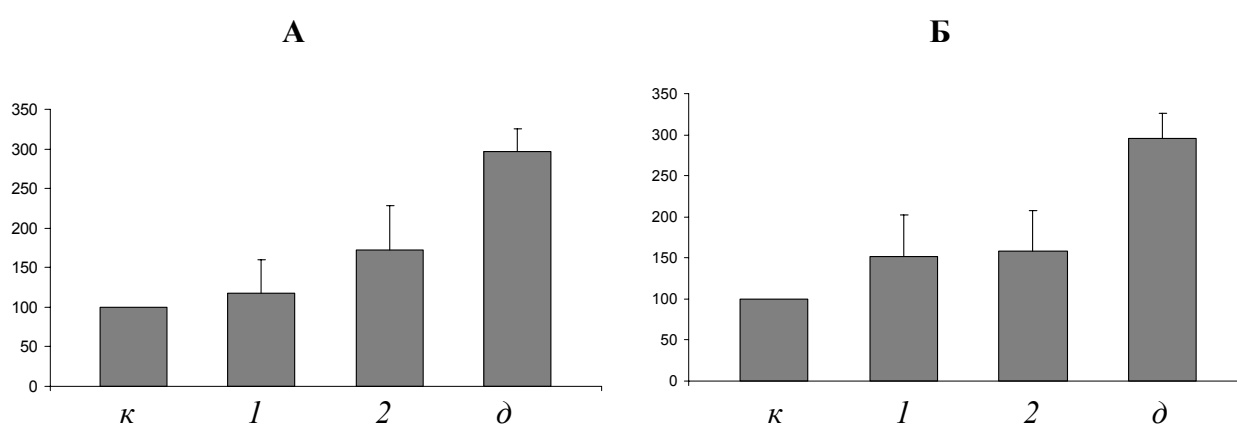


Рисунок 2 – Цитометрический анализ содержания фосфорилированной АТМ в клетках HeLa после инфекции *H. pylori* P12 (А) и *H. pylori* ΔРАІ (Б) 5ч; к - клетки без обработки бактериями; 1-2 – 200 и 500 бактерий на клетку соответственно, д – обработка доксорубицином.

Активация субстратов АТМ/АТР каскада: Chk1, Chk2, и p53

Следующим этапом работы явился поиск субстратов, активированных киназой АТМ после инфицирования хеликобактером. Известно, что АТМ киназа способна фосфорилировать множество субстратов по одному сайту. Основываясь на этом, мы провели иммуноблотинг с антителом против спектра известных субстратов. Прежде всего, мы показали, что при инфекции AGS клеток бактериями дикого типа *H. pylori* P12 и мутантными бактериями *H. pylori* ΔРАІ происходит фосфорилирование белков, совпадающих по своим молекулярным массам с известными АТМ/АТР субстратами Chk1 и Chk2 (62 и 56 kDa), соответственно (рисунок 3). Кроме этих двух белков, инфекция *H. pylori* особенно индуцирует фосфорилирование белка с молекулярной массой 32 kDa. Аналогичное фосфорилирование трех упомянутых белков происходит и в HeLa клетках, инфицированных *H. pylori* (рисунок 4, дорожки 2, 3, и 4). Необходимо отметить, что фосфорилирование всех трех субстратов происходит как при инфекции клеток хозяина диким типом *H. pylori* P12, так и мутантом *H. pylori* ΔРАІ (рисунок 3). Таким образом, фосфорилирование субстратов АТМ/АТР киназ не зависит от типа инфицированной клеточной линии (AGS или HeLa) и от наличия sagРАІ.

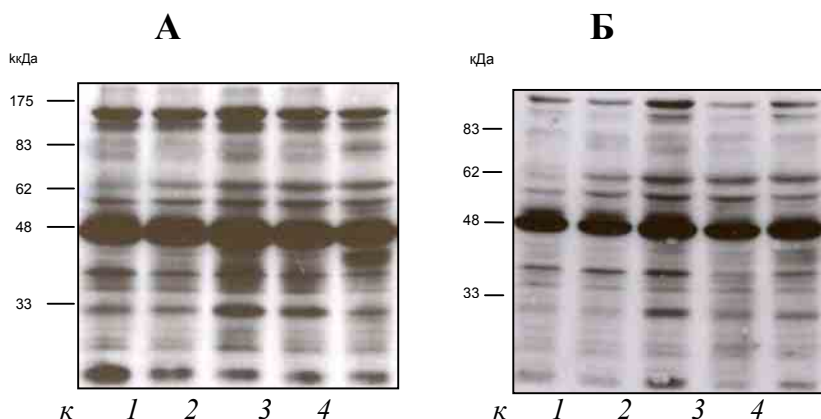


Рисунок 3 – Содержание фосфорилированных субстратов ATM в клетках AGS после инфицирования *H. pylori* P12 (А) и *H. pylori* ΔPAI (Б) в концентрации 100 бактерий на клетку. Дорожки: κ - клетки без обработки бактериями; 1-4 - клетки через 30 мин, 90 мин, 3 ч и 6 ч инфицирования.

Чтобы доказать, что фосфорилирование белков в клетках хозяина осуществляют ATM/ATR киназы, мы провели иммуноблотинг лизатов клеток хозяина, инфицированных *H. pylori*, в присутствии специфичного ингибитора этих киназ с тем же антителом. Результаты экспериментов показали, что ингибитор подавляет фосфорилирование белка, соответствующего по молекулярной массе киназе Chk1. В то же время снижения уровня фосфорилирования Chk2 не происходит (рисунок 4, дорожки 2*, 3*, 4*). При обработке клеток хозяина доксорубицином, активатором ATM/ATR, в присутствии ингибитора оба белка не фосфорилировались (рисунок 4, дорожка д*). Таким образом, фосфорилирование Chk2 при *H. pylori* инфекции может происходить при участии другой, отличной от ATM или ATR киназы.

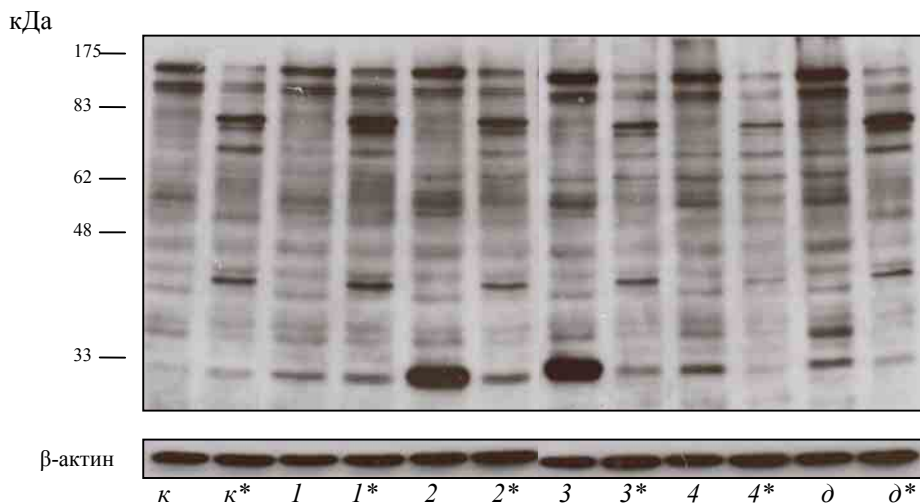


Рисунок 4 – Содержание фосфорилированных субстратов ATM в клетках HeLa после инфицирования *H. pylori* в концентрации 200 бактерий на клетку. Дорожки: κ – клетки без обработки бактериями; д – обработка доксорубицином; * – обработка ATM/ATR ингибитором; 1-4 клетки через 30 мин, 90 мин, 3 ч и 6 ч инфицирования соответственно.

Для установления активации конкретных белков мы провели иммуноблотинг с антителами против фосфорилированной формы Chk2 и p53 (p-Chk2 и p-p53 соответственно). Было обнаружено фосфорилирование белка Chk2 сразу после 90 мин инфицирования клеток AGS (рисунок 5, А), которое увеличивалось после 3 ч и 6 ч инфекции. Дополнительно клетки обработали ингибитором ATM в варианте с шестичасовой инфекцией. Однако, ингибирование фосфорилирования не произошло, более того, появилась новая

полоса в непосредственной близости от маркера с молекулярной массой 62 кДа, что свидетельствует об участии другой киназы помимо ATM, в активации Chk2. При этом обработка доксорубицином, классическим активатором ATM, приводила к высокому уровню фосфорилирования Chk2. Это еще раз подтверждает, что активация Chk2, субстрата ATM, осуществляется иной киназой, отличной от ATM и ATR. Аналогичная динамика активации происходила и в клетках HeLa (рисунок 5, Б) в тех же условиях.

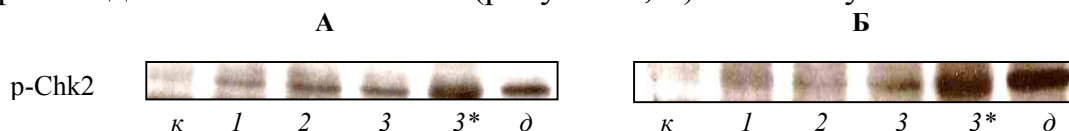


Рисунок 5 – Содержание фосфорилированной формы Chk 2 в клетках AGS (а) и HeLa (б) после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку. Дорожки: κ - клетки без обработки бактериями; δ – обработка доксорубицином; * - обработка ATM/ATR ингибитором; 1-3 клетки через 30 мин, 90 мин, 3 ч и 6 ч инфицирования соответственно.

При длительном инфицировании обеих клеточных линий наблюдается активация Chk2 после 24 ч в клетках AGS и HeLa. Проверка активации белка p53, как одного из субстратов ATM-киназы, показала, что *H. pylori* не вызывает изменений в уровне фосфорилирования p53, что оказалось достаточно необычным, так как p53 является субстратом Chk2, как непосредственно, так и через ATM.

Выявление новых активированных субстратов ATM/ATR киназ после инфекции *H. pylori*

Для лучшего разделения белков нами был проведен двумерный электрофорез, позволяющий получить более подробную картину активации субстратов ATM/ATR киназ. Также проводили разделение и лизата неинфицированных клеток.

Чтобы идентифицировать белки, фосфорилируемые ATM/ATR киназами, мы инфицировали AGS клетки *H. pylori* P12 в течение 90 мин. Белки неинфицированных и инфицированных AGS клеток были разделены с использованием двумерного гель-электрофореза, перенесены на мембрану и проанализированы, используя антитело против фосфо-(Ser/Thr) ATM/ATR субстратов (рисунок 6). Антитело реагировало с целым рядом белков в неинфицированных клетках, что свидетельствует о важной роли, которую играют субстраты ATM/ATR киназ в нормальном функционировании клеток хозяина. После инфекции мы наблюдали увеличение уровня фосфорилирования уже модифицированных белков (рисунок 6, А). Кроме того, в результате инфекции появились 9 новых сигналов (рисунок 6, А*), что свидетельствует о повышении активности ATM/ATR киназ в результате инфекции. Необходимо отметить, что происходило не только фосфорилирование, но и дефосфорилирование ряда белков в результате инфекции (рисунок 6, А*, стрелки). Таким образом, использование двумерного гель-электрофореза, имеющего более высокую, чем одномерный гель-электрофорез, разрешающую способность, позволяет выявить большее количество различных в уровне фосфорилирования субстратов ATM/ATR киназ.

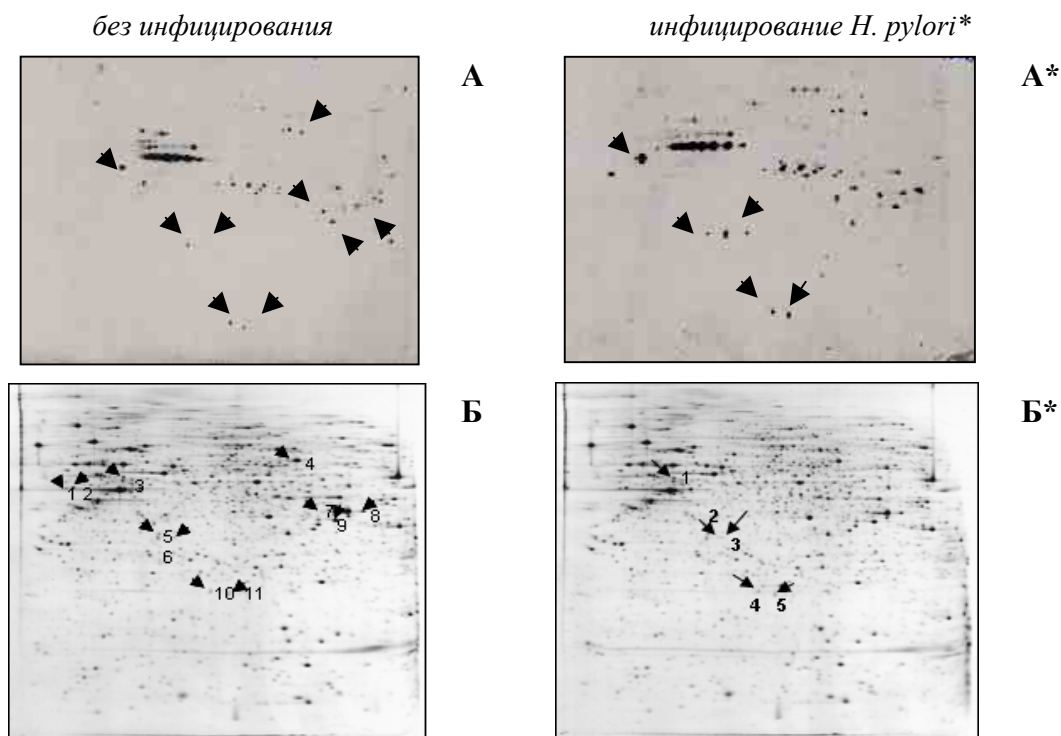


Рисунок 6 – Двумерное электрофоретическое разделение белков клеток AGS без инфицирования (слева), и после 90 мин инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку – *H. pylori** (справа). А – иммуноблоттинг с антителами против фосфо-(Ser/Thr) ATM/ATR субстратов, стрелками отмечены белки, содержание которых изменяется; Б – окраска геля CBB-R250, стрелками и номером отмечены белки для идентификации MALDI.

Идентификация активированных белков методом масс-спектрометрии в клетках AGS после инфицирования *H. pylori*

Один из наиболее точных способов идентификации белков является MALDI масс-спектрометрия, позволяющая с высокой долей вероятности определить тот или иной белок. Мы выделили (рисунок 6, Б, стрелки) наиболее измененные инфекцией по уровню фосфорилирования белки и идентифицировали их с помощью MALDI масс-спектрометрии. Результаты масс-спектрометрии белков неинфицированных клеток представлены в таблице 1. Среди них не были обнаружены белки, имеющие сайт фосфорилирования ATM/ATR киназами. Мы проанализировали также белки AGS клеток после инфекции (рисунок 6, Б*, таблица 2) и обнаружили 2 белка, №1 и №3, которые являются субстратами ATM/ATR, а именно гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин F (hnRNP F) и репликационный белок A2 (RPA32A). Более изученный RPA32A представляет для нас интерес, так как именно гиперфосфорилирование белка с молекулярной массой 32 kDa в AGS клетках после инфицирования *H. pylori* было детектировано в Вестерн-блот анализе (рисунок 4, дорожки 2, 3).

Таблица 1

Результаты MALDI масс-спектрометрического анализа белков клеточного лизата AGS без обработки бактериями

Номер белка, №	Результат идентификации
1	предшественник ретикулокальбина 1
2	подобный 40S рибосомальному протеину SA (р 40)
3	TXNDC5 белок
4	пируват киназа мускул человека, цепь A (Pkm2)
5	β - субъединица кэпирующего F-актин белка (CapZ beta)
6	Не определен
7	ассоциированный со старением белок гена 9
8	Гетерогенный нуклеорибонуклеопротеин A2/B1 изоформа B1
9	Гетерогенный нуклеорибонуклеопротеин A2/B1 изоформа B1
10	сплайсинг фактор аргинин/серин 3, изоформа CRA_c
11	сплайсинг фактор аргинин/серин 3, изоформа CRA_c

Таблица 2

Результаты MALDI масс-спектрометрического анализа белков клеточного лизата AGS после 90 мин инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку

Номер белка, №	Результат идентификации
1	гетерогенно ядерный рибонуклеопротеин F *
2	тиоредоксин редуктаза (trxB)**
3	репликационный белок A2, 32kDa *
4	сплайсинг фактор аргинин/серин 3, изоформа CRA_c*
5	сплайсинг фактор аргинин/серин 3, изоформа CRA_c*

Исключение влияния ДНК-ПК на активацию RPA 32A

Известно, что RPA 32A является субстратом как АТМ киназы, так и другой ДНК-ПК, входящей в то же семейство киназ. Поскольку нами уже показано, что АТМ киназа активируется в ответ на хеликобактерную инфекцию, необходимо было исключить возможность того, что фосфорилирование данного белка с молекулярной массой 32 kDa осуществляется ДНК-ПК, которая также активируется после появления двойных разрывов ДНК [Niu *et al.*, 1997]. Мы инфицировали HeLa и AGS клетки в присутствии ингибитора данной киназы. Вестерн-блот анализ лизатов инфицированных клеток показал, что

ингибирование ДНК-ПК не снижает уровень фосфорилирования белка с молекулярной массой 32 kDa в обоих типах клеток (рисунок 7). Это означает, что этот белок является непосредственным субстратом ATM/ATR.

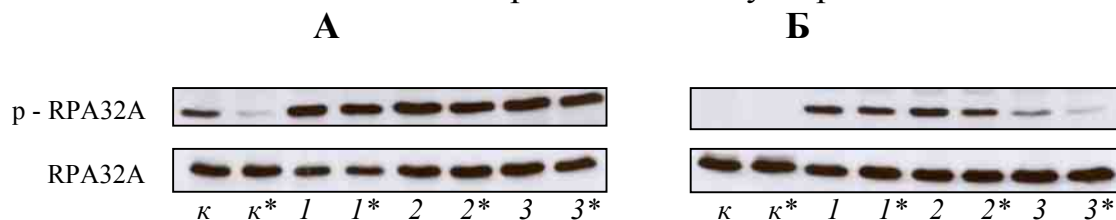


Рисунок 7 - Содержание фосфорилированной формы RPA32A в клетках AGS (А) и HeLa (Б) после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 200 бактерий на клетку. Дорожки: к - клетки без обработки бактериями; * - обработка DNK-ПК III ингибитором; 1-3 клетки через 30 мин, 90 мин и 6 ч инфицирования соответственно.

Активации каскада митоген активированных киназ (МА киназ) и бактериального белка CagA в присутствии ATM/ATR и DNK-ПК I, III ингибиторов

Инфицирование клеток штаммами *H. pylori*, несущими островок патогенности PAI, приводит к активации МА киназ стрессового ответа атакованной клетки: JNK, p38, и ERK [Naumann *et al.*, 1999; Keates *et al.*, 1999; Wessler *et al.*, 2000; Pomorski *et al.*, 2000]. До сих пор неизвестно, что инициирует запуск МА киназного каскада при инфицировании эукариотических клеток штаммами *H. pylori* [Ding *et al.*, 2008]. В ходе исследования нами было показано, что инфекция *H. pylori* приводит к активации ATM киназы, способной фосфорилировать большое количество субстратов. Необходимым этапом работы явилось установление участия данной киназы в запуске МА киназного каскада. Кроме этого, мы провели анализ уровня фосфорилирования тирозина бактериального белка CagA и его количества в атакованной клетке. При классическом течении инфекции тирозин фосфорилируется семейством Src киназ клетки хозяина. Хотя большинство работ по исследованию активации МА киназного каскада проводится на клеточной культуре AGS, нами были инфицированы и клетки HeLa, так как важные результаты об активации ATM с использованием цитометрического анализа были получены именно на данной клеточной линии.

Клетки AGS и HeLa были инфицированы диким типом *H. pylori* P12 и обработаны тремя ингибиторами: DNK-ПК I, DNK-ПК III и ATM/ATR. Затем последовательно было проанализировано содержание активированных форм белков JNK, ERK 1 2, и p38 методом иммуноблотинга.

Обработка клеток ингибиторами DNK-ПК I и DNK-ПК III не повлияла на активацию белка JNK в обеих клеточных линиях. При обработке ATM/ATR ингибитором мы наблюдали снижение фосфорилирования JNK в начале инфицирования после 30 мин, а при трехчасовой инфекции в клетках AGS, и клетках HeLa изменение содержания p-JNK при ингибировании ATM и ATR киназ не наблюдалось. Анализ активации белка p38 показал, что в клетках AGS и HeLa не происходило снижения количества активированной формы p38 при

обработке ингибиторами DNK-ПК I и DNK-ПК III. ATM/ATR ингибитор повлиял на фосфорилирование p38 как в HeLa, так и в AGS клетках при трехчасовой инфекции. В клетках AGS мы наблюдали лишь небольшое снижение, в то время как в HeLa активная форма практически отсутствовала. Сходная ситуация наблюдалась и с белком p-ERK 1,2, активация которого не зависела от ДНК-ПК киназы.

Наиболее интересным было обнаружение ингибирования активации ERK 1,2 в клетках HeLa после ингибирования ATM и ATR киназ, которое было наиболее заметным при 30 мин инкубирования с бактериями (рисунок 8, А, дорожка 1*).

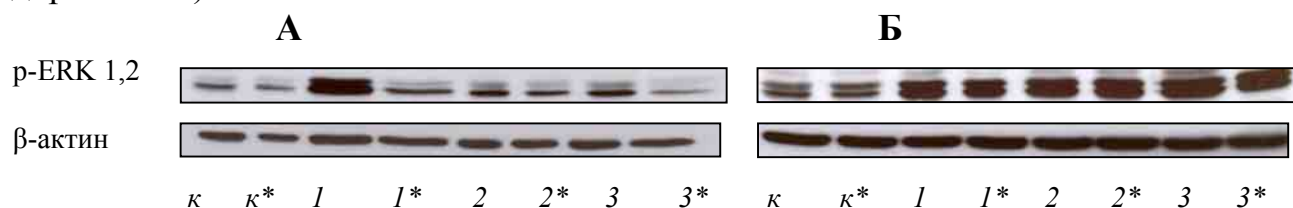


Рисунок 8 – Содержание фосфорилированной формы ERK 1,2 в клетках HeLa (А) и AGS (Б) после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 200 бактерий на клетку. Дорожки: κ - клетки без обработки бактериями; * - ATM/ATR ингибитором; 1-3 клетки через 30 мин, 90 мин и 3 ч инфицирования соответственно.

Помимо активации белков МА киназного каскада, нами был отслежен широко изученный процесс проникновения в клетку хозяина белка CagA с последующем фосфорилированием тирозина, входящего в его состав при обработке ингибиторами. Ни один из ингибиторов не помешал внедрению CagA белка в клетки AGS, а также фосфорилированию тирозина.

Выявление повреждений ДНК в клетках HeLa и AGS методом ДНК-комет после инфекции *H. pylori*

Одним из современных прямых методов определения генотоксичности является метод гель-электрофореза изолированных клеток или ДНК-комет (Comet Assay). Выбор метода не являлся случайным, данная методика чувствительна к повреждениям ДНК, относящимся к двунитевым разрывам, которые, как известно, вызывают активацию ATM киназы, что показано в нашей работе. Инфицирование проводили как диким типом *H. pylori* P12, так и менее агрессивным мутантом *H. pylori* ΔPAI, так как оба штамма активировали ATM при цитометрическом анализе. Мы установили, что в течение инфекции, длящейся 6 ч, не наблюдается гибели клеток и повреждений ДНК, о чем свидетельствуют одинаковые значения ТМ в опытном варианте, где клетки инкубировались с *H. pylori* P12 и *H. pylori* ΔPAI, и контрольном без инкубации с бактериями (рисунок 9, рисунок 10, А). При этом схожие данные получены как на клетках AGS, так и на HeLa. После 12 ч инфицирования не наблюдали превышения гибели клеток в опытных вариантах с обоими штаммами по сравнению с неинфицированными клетками. Также не возросли значения ТМ, что говорит об отсутствии генотоксического эффекта патогена в данных условиях инкубации (рисунок 10, Б). Известно, что бактерия, несущая *cagPAI*, индуцирует более высокий уровень внутриклеточных АФК в клетках эпителия

желудка, чем ΔРАІ штамм. Однако именно инфицирование клеток с *H. pylori* ΔРАІ в течение 24 ч неожиданно выявило увеличение значений ТМ клеток по сравнению с *H. pylori* P12 (рисунок 10, С). Наши данные свидетельствуют, что после инфицирования *H. pylori* ΔРАІ в течение 24 ч выявляется резкое увеличение значений ТМ в AGS клетках (рисунок 25, с).

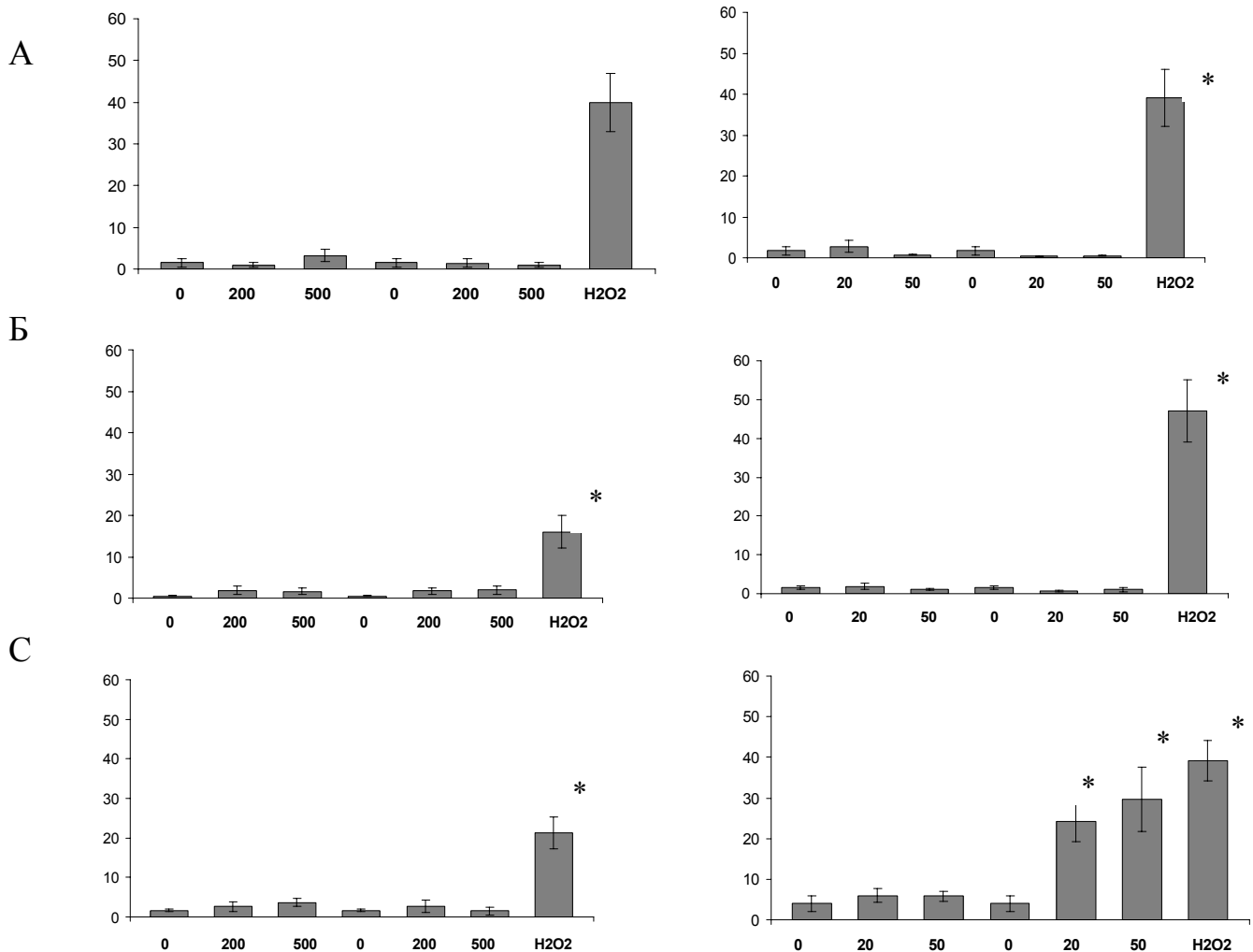


Рисунок 9 – Значение момента «хвоста кометы» ТМ после инфицирования клеток HeLa двумя штаммами *H. pylori* P12 и ΔРАІ. А - инфекция 1 ч, Б – инфекция 3 ч, С – инфекция 6 ч. * - $p < 0.001$

Рисунок 10 – Значение момента «хвоста кометы» ТМ после инфицирования клеток AGS двумя штаммами *H. pylori* P12 и ΔРАІ. А - инфекция 6 ч, Б – инфекция 12 ч, С – инфекция 24 ч. * - $p < 0.001$

Отсутствие индукции «колибри» - фенотипа клеток AGS при инфицировании *H. pylori* в присутствии ATM/ATR и DNK-PK I, III ингибиторов

In vitro инфицирование *cag* PAI-положительными штаммами AGS клеток приводит к характерным изменениям в клеточной морфологии, приводящим к так называемому “колибри” – фенотипу, характеризующемуся элонгацией и уплощением клеток [Segal *et al.*, 1996]. На рисунке 11 представлены фотографии неокрашенных клеток AGS без инфекции и инфицированных *H. pylori* P12 при

обработке ATM/ATR, DNK-ПК I и DNK-ПК III ингибиторами. Видно, что ингибирование ДНК-ПК киназы не повлияло на формирование фенотипа «колибри» (рисунок. 11, Д, Е): клетки также удлинялись и изменяли форму, как и при инфицировании *H. pylori* P12 (рисунок 11, Б). При обработке ATM/ATR ингибитором инфицирование клеток диким типом не привело к формированию фенотипу «колибри» (рисунок 11, С). В клетках происходила вакуолизация цитоплазмы, характерная для активного инфицирования.

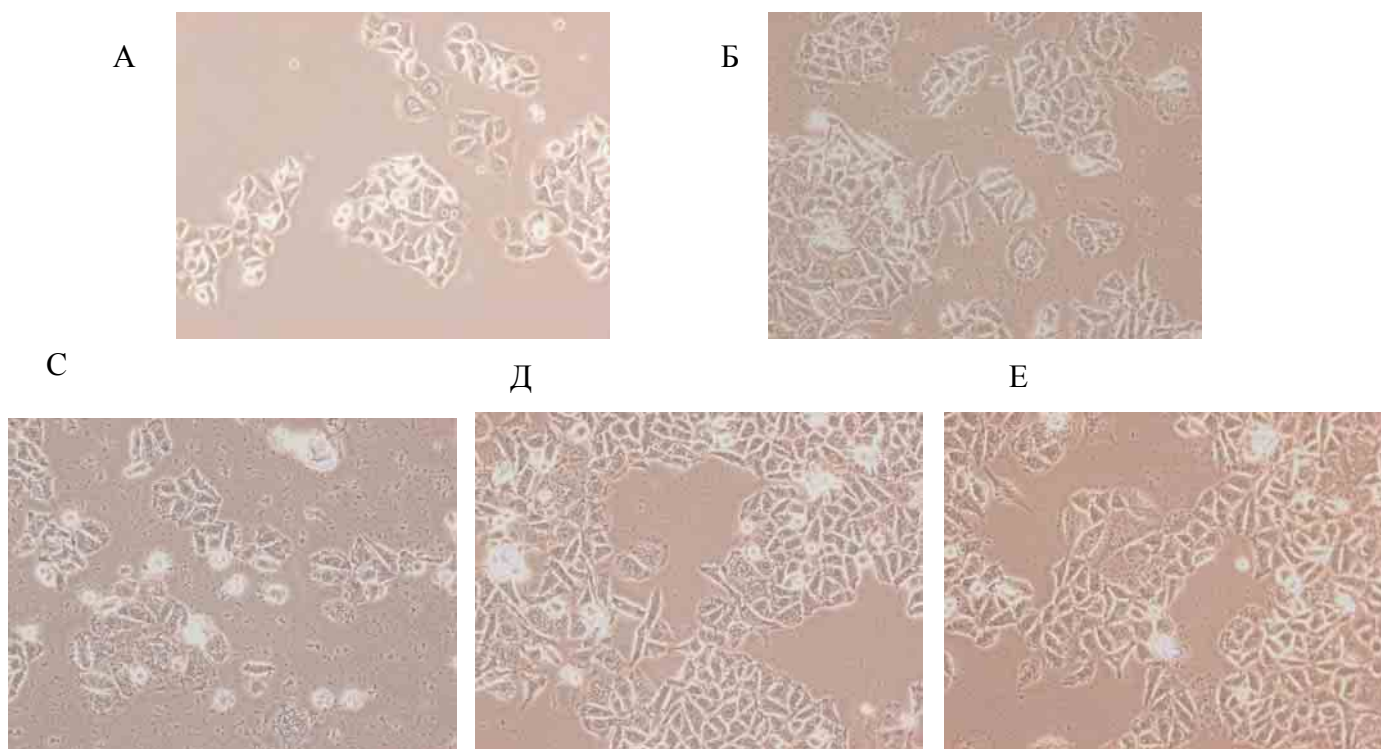


Рисунок 11 – Формирование фенотипа «колибри» клеток AGS инфицированных *H. pylori* P12 при обработке ингибиторами. А – intactные клетки; Б – инфицированные *H. pylori* P12; С- инфицированные *H. pylori* P12 и обработанные ATM/ATR ингибитором; С - инфицированные *H. pylori* P12 и обработанные DNK-ПК I ингибитором; е - инфицированные *H. pylori* P12 и обработанные DNK-ПК III ингибитором.

Обсуждение результатов

Инфекция *H. pylori* как возможный генотоксический агент

В последние годы была выявлена исключительно важная этиологическая роль *H. pylori* в заболевании раком желудка. Инфицируя желудок, эта бактерия во многих случаях постепенно вызывает формирование начальных предопухолевых изменений слизистой оболочки желудка — метаплазии тонкокишечного типа [Аруин с соавт., 1993; Correa, 1992; Crepsi *et al.*, 1996; Hill,

1994; IARC, 1994; Koster *et al.*, 1994; Reed, 1996] и резко повышает риск заболевания раком желудка.

Ряд исследований подтверждает связь инфекции с повреждением ДНК *in vitro* [Sugiyama *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1998]. Однако доказательств наличия прямого генотоксического действия *in vivo* не только хеликобактерной, но и вообще бактериальной инфекции, достаточно немного. Результаты проведенных нами экспериментов позволили установить, что после инфицирования *H. pylori* ΔРАІ в течение 24 ч выявляется резкое увеличение значений хвоста кометы (основного показателя двойных разрывов ДНК) в эпителиальных клетках желудка (рисунок 10), что не наблюдалось при инфицировании диким, более агрессивным типом бактерии при тех же условиях. В месте с тем нельзя не учитывать, что культивирование клеток с бактериями, синтезирующими весь набор факторов вирулентности, в течение 24 ч привело к гибели около половины клеток. Поскольку нами был выявлен генотоксический эффект инфекции хеликобактера, у которого отсутствует островок патогенности, участвующий в усилении воспалительного процесса, можно предполагать, что при атаке диким типом наиболее поврежденные клетки погибали, и детекция повреждений ДНК не представлялась возможной. Мы не исключаем наличие повреждений генома клетки хозяина «полноценным» штаммом хеликобактера, тем более что подавляющее большинство исследований говорят о крайне важной роли данных генов патогенности в индукции не только воспалительного процесса, но и повреждений ДНК. Предположительно, механизм повреждения ДНК, с бактерией, не синтезирующей каких-либо канцерогенных веществ, связан с образованием АФК в слизистой оболочке посредством проникновения бактериального белка CagA в эпителиальные клетки желудка. В то же время нами установлено, что бактерии, не способные к синтезу белка CagA, также индуцируют дву- и одноцепочечные разрывы ДНК. Результаты нашей работы свидетельствуют об особой опасности хронических инфекций маловирулентными штаммами *H. pylori*.

Молекулярно-биохимические изменения статуса клетки-хозяина после инфицирования хеликобактером

Мы предположили, что, проследив активацию того или иного молекулярного каскада в инфицированной хеликобактером клетке, можно судить о нарушении геномного материала. Учитывая наши предыдущие данные о наличии поврежденной ДНК в эпителиальных клетках желудка после инфекции *H. pylori*, детекция активации АТМ/ATR–сигнального пути, активирующегося в ответ на двунитевые разрывы ДНК, восстановит этапность процесса реакции клетки на атаку патогена. Иммунологическими методами было показано, что инфицирование *H. pylori* Р12 клеточных линий эпителия желудка и эндометрия привело к активации АТМ киназы после 6 ч инкубирования с бактериями (рисунок 1). Обработка клеток специфическим АТМ/ATR ингибитором привела к полной отмене эффекта, что подтверждает фосфорилирование именно АТМ киназы. Мы установили, что активация АТМ киназы происходит не только в результате инфицирования диким типом хеликобактера, но и мутантным. С помощью цитометрического анализа было

показано присутствие p-ATM в клетках HeLa после инфицирования *H. pylori* ΔPAI, а также увеличение ее уровня при повышении концентрации бактерий при инкубировании (рисунок 2, Б). Действительно, появление двунитевых разрывов при инфицировании не зависит от наличия островка патогенности, что говорит об альтернативном пути воздействия на ДНК клетки хозяина, помимо предположительной роли проникновения CagA белка.

Активация ключевой ATM киназы в сигнальном каскаде приводит к различным процессам: репарации, апоптозу, остановке клеточного цикла и другим последствиям. Исход зависит от того, какой из субстратов будет активирован в дальнейшем. Нами установлено, что инфицирование хеликобактером приводит к активации одного из компонентов чекпойнт контроля—киназы Chk2. При возникновении повреждений ДНК p-Chk2 фосфорилирует различные мишени, среди которых опухолевые супрессоры p53 и BRCA1, а также фосфатаза Cdc25C, играющая важную роль в регуляции G1 и G2-чекпойнтов. Обнаруженное в ходе работы отсутствие активации p53 говорит о том, что, вероятно, остановка происходит именно в G2 фазе, которая регулируется самой Chk2, в то время как в G1-чекпойнт является p53—опосредованным. Можно сделать вывод, что эта остановка приводит к возможности осуществления репарационных процессов, а не апоптозу, что подтверждено нами в дальнейшем. Одной из реакций клетки на атаку патогена является остановка клеточного цикла в этих фазах. Интересным является тот факт, что ингибирование ATM и ATR киназы не приводило к угнетению фосфорилирования Chk2 белка при инфицировании хеликобактером (рисунки 4, 5), что позволяет делать вывод, что в его активации принимает участие другая киназа, отличная от ATM или ATR.

Наши результаты полностью подтверждают данные литературы о ATR—Chk1 взаимодействии. Нами было показано, что фосфорилированная форма ATR протеинкиназы присутствует в интактных клетках HeLa конститутивно, и ее активация ингибируется ATM/ATR ингибитором. При этом ее субстрат, Chk1, также был обнаружен нами в активированной форме в неинфицированных клетках (рисунки 3, 4). Однако мы наблюдали небольшое увеличение количества p-Chk1 после 90мин и 3ч инфицирования, что не могло быть связано с ATR киназой, так как ее уровень в ходе инфицирования оставался постоянным. Эти результаты дают возможность предположить участие ATM киназы в фосфорилировании Chk1 при инфекции хеликобактером.

Для понимания того, какие же процессы иницируются в ходе активации ATM/ATR сигнального каскада, необходимо установить конкретные субстраты, фосфорилируемые после инфицирования хеликобактером. Большое число субстратов, ограниченное количество методов, а также дорогостоящие антитела при использовании наиболее распространенных иммунологических способов идентификации осложняют задачу поиска этих субстратов.

В начале нашей работы мы использовали антитело, узнающее специфический мотив, по которому ATM фосфорилирует свои субстраты. Однако Вестерн-блот анализ при одномерном электрофорезе выявил белки с большой степенью фосфорилирования после инфекции *H. pylori*, не описанные в

протоколе данного антитела (рисунки 3, 4). Это привело нас к следующей схеме эксперимента: выделение всех белков эпителиальных клеток желудка до и после инфицирования → проведение двумерного электрофореза в большом геле → Вестерн-блот анализ с использованием антитела против субстратов ATM → сравнение уровня фосфорилирования белков → окраска гелей кумасси R250 → выбор пятен на геле → идентификация их MALDI масс-спектрометрией. Таким образом, мы исключили перебор всех субстратов специфическими и довольно дорогостоящими антителами, а также значительно увеличили точность анализа белков. Данный способ поиска активированных белков позволил нам полностью подтвердить наше предположение о том, что гиперфосфорилированный субстрат ATM (на рисунке 4, с примерной молекулярной массой 32 кДа) является репликационным белком A (RPA32A) (таблица 2). В литературе встречаются данные, что RPA32A является одним из субстратов не только ATM, но и другой ДНК-ПК, входящей в то же семейство киназ. Параллельно нами была исключена роль ДНК-ПК в фосфорилировании RPA32A (рисунок 8). В обычной фосфорилированной форме этот белок конститутивно функционирует в клетке, связываясь с одноцепочечными концами ДНК при репликации. Его гиперфосфорилирование является результатом активирования ATM киназы в ходе генотоксического стресса клетки различными агентами, а в нашем случае – инфекцией *H. pylori*. Помимо RPA32A, были идентифицированы еще два новых белка: гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин F (hnRNP F) и сплайсинг фактор аргинин/серин 3. hnRNP F играет позитивную роль в производстве проапоптотического регулятора Bcl-xS в ходе альтернативного сплайсинга в клетках HeLa. Можно сделать предположение о том, что фосфорилирование ATM киназой hnRNP F и сплайсинг фактора аргинин/серин 3 приводит к изменению их функционирования в процессах альтернативного сплайсинга в клетках, атакованных хеликобактером. В результате этого синтез нехарактерных проапоптотических белков может являться одной из причин формирования необратимых изменений в тканях, приводящих к раку желудка. Сравнительный анализ результатов иммуноблотинга демонстрирует целую сеть белковых взаимодействий, вовлеченных в клеточный ответ при инфицировании хеликобактером. Эта сеть включает как процессы фосфорилирования, так и дефосфорилирования, а ее многокомпонентность вызывает растущий интерес исследователей.

Участие ATM киназы в инициации митоген активированных (МА) киназ ответа клетки на стресс и формировании фенотипа «колибри»

Инфицирование клеток штаммами дикого типа *H. pylori* приводит к инициации ERK, JNK и p38 киназ, что было показано во многих исследованиях [Naumann *et al.*, 1999; Pomorski *et al.*, 2000]. Проведенный иммунохимический анализ наличия активированных форм JNK и p38 белков данного семейства в присутствии специфических ингибиторов ATM/ATR и ДНК-ПК киназ, используемых ранее в нашей работе, показал классический ответ клетки на инфекцию. Ингибирование ATM киназы также не повлияло на проникновение в клетку и фосфорилирование бактериального белка CagA при инфицировании *H. pylori* P12. Однако при ингибировании ATM киназы мы наблюдали снижение

уровня p-ERK 1,2 (рисунок 8), особенно заметного в первые 30 мин инфицирования клеточной культуры эндометрия. Если ATM киназа принимает участие в фосфорилировании белка ERK 1,2, то остается неясным факт отсутствия активации ATM в первые 30 мин инфекции не зафиксирована (рисунок 1). Его можно объяснить тем, что для активации одной молекулы субстрата не требуется именно одна молекула ATM киназы. Одна молекула p-ATM способна фосфорилировать множество молекул своего субстрата. Таким образом, ATM киназа, вероятно, действительно активируется в первые полчаса инфицирования, но ее количество мало для детекции с помощью использованных антител, хотя и достаточно для фосфорилирования субстратов, одним из которых является белок ERK 1,2.

Интересной оказалась фенотипическая реакция, а точнее ее отсутствие, на инфицирование *H. pylori* P12 эпителиальных клеток желудка в присутствии ATM/ATR ингибитора. Классическим ответом клетки на инфицирование являются морфологические изменения, характеризующиеся элонгацией и уплощением клеток [Segal *et al.*, 1996]. Однако при ингибировании ATM и ATR киназ эти изменения не были обнаружены. Данные результаты подтверждают возможное участие ATM киназы в стрессовом ответе клетки путем взаимодействия с белком ERK 1,2, который принимает участие в передаче сигнала, приводящего к формированию фенотипа «колибри». Нами было проверено влияние ДНК-ПК ингибитора на формирование данного фенотипа. В присутствии данного агента клетки реагировали на инфекцию также, как и в контроле, без каких-либо дополнительных воздействий. Это свидетельствует о том, что участие ATM киназы в данном процессе достаточно специфично.

Результаты ряда последовательных экспериментов, проведенных в данной работе, позволили нам схематично изобразить поэтапный каскад реакций, происходящих в клетке, атакованной бактерией *H. pylori* (рисунок 12). На **первом этапе** индуцируются повреждения ДНК, вызванные атакой *H. pylori*. Механизм возникновения повреждений, а конкретнее, двунитевых разрывов, остается не ясным. Наши данные не подтверждают предположение некоторых ученых об участии CagA белка в генотоксическом эффекте. Штамм, дефектный по островку патогенности также вызывал повреждения ДНК. **Второй этап:** двунитевые разрывы ДНК являются сигналом для активации ATM киназы, что происходит при инфицировании как диким типом, так и мутантным штаммом бактерии. Фосфорилированные гомодимерные формы этой киназы на **третьем этапе** активируют ряд своих субстратов, 4 из которых были идентифицированы. Белок Chk2 фосфорилируется, активируя тем самым чекпоинт (остановку клеточного цикла) в G2 фазе, что дает возможность клетке репарировать поврежденную ДНК при участии гиперфосфорилированного белка RPA32A. Отсутствие p-p53 говорит о том, что клетка не идет далее по пути апоптоза. Кроме классических субстратов, а также последствий, вызванных генотоксическим стрессом, нами были идентифицированы еще два белка, фосфорилированные ATM киназой в ответ на инфекцию. Это гетерогенно ядерный рибонуклеопротеин F и сплайсинг фактор аргинин/серин 3. На

четвертом этапе клетка запускает такие процессы сохранения геномного материала и выживания, как остановка клеточного цикла и репарация.

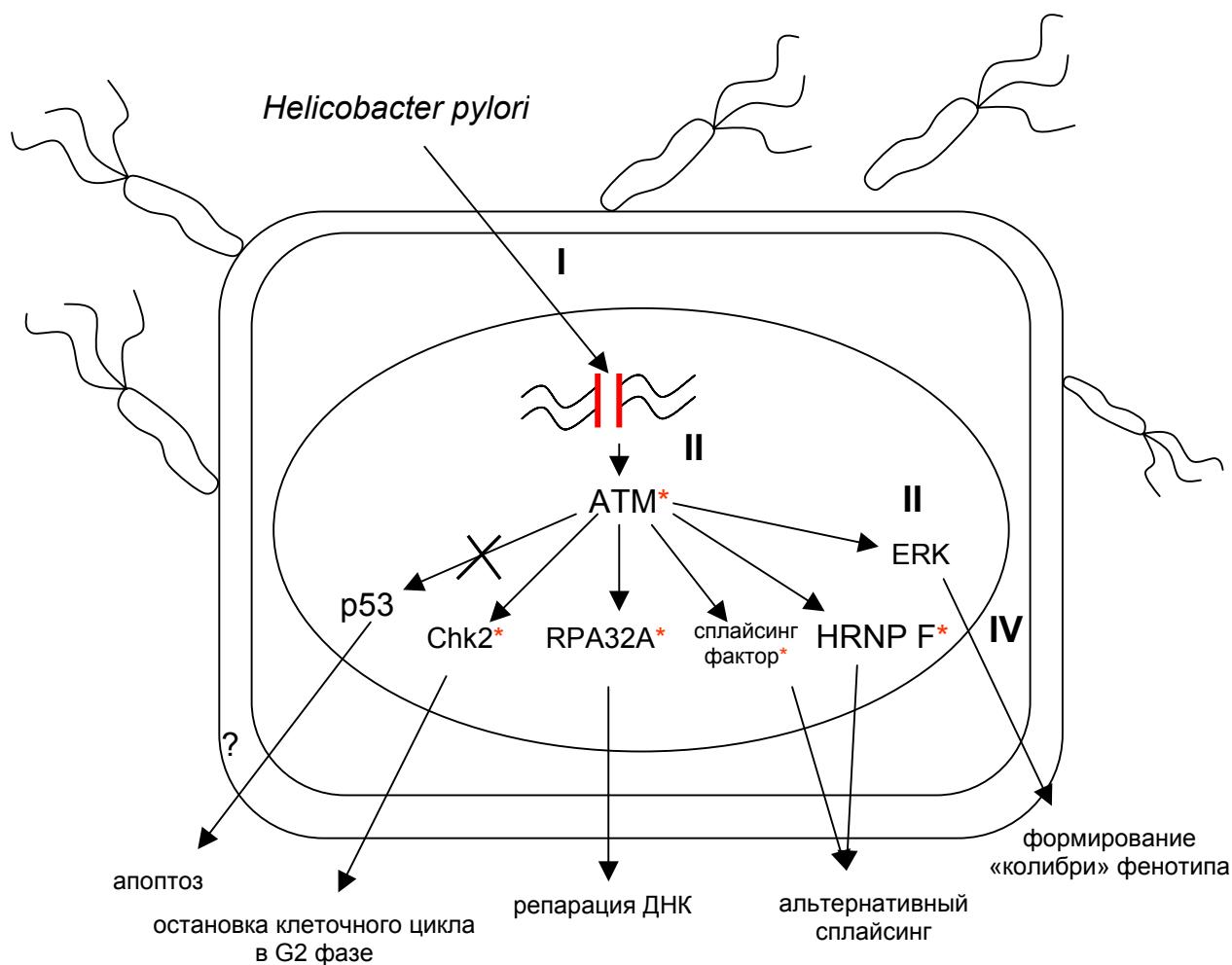


Рисунок 12 - Этапы клеточного ответа на инфекцию *H. pylori*

ВЫВОДЫ

1. Штамм хеликобактера, дефектный по островку патогенности, обладает генотоксическим эффектом.
2. Установлено, что инфекция *H. pylori* активирует ключевую ATM киназу клеточного ответа на двунитевые разрывы ДНК в эпителиальных клетках желудка и эндометрия, независимо от наличия белка CagA.
3. Активированная ATM киназа фосфорилирует белок Chk2, регулирующий остановку клеточного цикла и RPA32A, участвующий в репарации ДНК.
4. Идентифицированы новые субстраты ATM киназы, фосфорилируемые ею в ответ на инфицирование хеликобактером: гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин F и сплайсинг фактор аргинин/серин 3.
5. ATM киназа взаимодействует белком ERK 1,2, который принимает участие в формировании фенотипа «колибри», классического морфологического ответа на инфицирование хеликобактером.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Аникеенко М.О.** Обнаружение генотоксичности *Helicobacter pylori* ДРАІ методом ДНК-комет / **М.О. Аникеенко**, О.Н.Ильинская // Цитология. – 2008. – Т.50 (11). - С. 1005-1008.

2. **Аникеенко М.О.** Вклад инфекции *Helicobacter pylori* в остановку клеточного цикла эукариот / **М.О. Аникеенко**, О.Н. Ильинская // Ученые записки Казанского государственного университета. Сер. Естественные науки. – 2009. – Т. 151, Кн. 3. – С. 56-59.

3. **Anikeenok M.O.** *Helicobacter pylori* infection induces phosphorylation of ATM/ATR substrates in host cells / **M.O. Anikeenok**, Y.N. Churin, T.F. Meyer, O.N. Ilinskaya // World Applied Sciences Journal.- 2009. - V. 6, Supplement 2. - P. 158-161.

4. **Аникеенко М.О.** Характеристика токсических и генотоксических эффектов новых производных карановой и ментановой структур по отношению к бактериям / **М.О. Аникеенко**, Л.Е. Никитина, О.Н. Ильинская // Вестник татарского отделения российской экологической академии. – 2006. – 1. – С. 23-26.

5. **Аникеенко М.О.**, Ильинская О.Н. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на генетический материал и ферментные системы микроорганизмов // Материалы междисциплинарной конференции с международным участием «Новые биокибернетические и телемедицинские технологии 21 века для диагностики и лечения заболеваний человека», - Петрозаводск, 2003. – С. 93.

6. Евтюгин В.Г., **Аникеенко М.О.**, Ильинская О.Н. Токсические и генотоксические свойства ряда новых препаратов производных - азулена, борнана и пинена // IX Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине», - Казань, 2004. – С. 125.

7. **Аникеенко М.О.**, Евтюгин В.Г., Ильинская О.Н. Токсические и генотоксические свойства синтезированных циклических соединений различных классов // IV Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века», - Казань, 2004. – С. 8.

8. **Аникеенко М.О.**, Ильинская О.Н. Генотоксические свойства штаммов *Helicobacter pylori*, различающиеся по степени патогенности // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, - Новосибирск, 2008, - С. 381.

9. **Anikeenok M.O.**, Ilinskaya O.N. Phosphorylation of ATM/ATR substrates in eukaryotic cells after infection with *Helicobacter pylori* // Abstr. I Conference on modern biology “Bionews”, Kazan. – 2008, – P.18.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю проф. О.Н.Ильинской за поддержку и внимательное отношение к работе; проф. Т.Ф.Майеру и доктору Ю.Н. Чурину (Институт Инфекционной Биологии Макса Планка, Берлин, Германия) за возможность проведения ряда экспериментов на базе Института; д.м.н. Г.В. Черепневу (Республиканская клиническая больница) за помощь в проведении цитометрических анализов; Монике Шмит за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа (Институт Инфекционной Биологии Макса Планка, Берлин, Германия).

Отзывы просим направлять по факсу: (843) 238-76-01 (отд. аспирантуры КГУ, дис. совет Д 212.081.08).